

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-245702

(43)公開日 平成8年(1996)9月24日

(51)Int.Cl.⁶
C 0 8 B 37/00
// C 1 2 P 19/04

識別記号

庁内整理番号

F I
C 0 8 B 37/00
C 1 2 P 19/04

技術表示箇所
Z
C

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁)

(21)出願番号	特願平7-52964	(71)出願人 595013106 水野 傳一 神奈川県鎌倉市岡本1丁目21番20号
(22)出願日	平成7年(1995)3月13日	(71)出願人 390025210 榎 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21 (72)発明者 水野 傳一 神奈川県鎌倉市岡本1丁目21番20号 (72)発明者 榎 源一郎 東京都世田谷区東玉川1丁目10番21号 (72)発明者 西沢 孝志 東京都北区西ヶ原2丁目35番12号 (74)代理人 弁理士 西澤 利夫

(54)【発明の名称】 高分子量リポポリサッカライド

(57)【要約】

【構成】 微生物菌体から得られ、a) タンパク質マークターを用いて SDS-PAGE 法で測定した分子量が 30,000 ~ 60,000 であり、分子量 10,000 以下の画分を実質的に含まないこと、b) エルゾン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が 3 ~ 9 個／分子量 30,000 であること、c) ジフェニルアミン法により測定した 2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が 20 ~ 30 個／分子量 30,000 であること、の特定の理化学的性質を有する高分子量リポポリサッカライド。

【効果】 安全性および生物活性が高く、医薬品等として使用し得る新規な高分子量 LPS が得られる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物菌体から得られ、次のa)～c)の理化学的性質、

a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が30,000～60,000であり、分子量10,000以下の画分を実質的に含まないこと、

b) エルソーン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が3～9個／分子量30,000であること、および

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が20～30個／分子量30,000であること、を有する高分子量リポポリサッカライド。

【請求項2】 微生物が、グラム陰性微生物である請求項1に記載の高分子量リポポリサッカライド。

【請求項3】 微生物が、パントエア (Pantoea) 属に属する微生物である請求項1または請求項2に記載の高分子量リポポリサッカライド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、高い生物活性と安全性を示し、かつ特定の理化学的性質を有する新規な高分子量リポポリサッカライドに関するものである。さらに詳しくは、この発明は、例えば免疫機能活性化剤等の薬剤開発に有用な、安全性の著しく改善された高分子量リポポリサッカライドに関するものである。

【0002】

【従来の技術】 リポポリサッカライド (lipopolysaccharide。以下LPSと記載することがある) は、大腸菌、サルモネラ菌、百日咳菌等のグラム陰性細菌細胞壁のペプチドグリカンを囲む外膜に存在する脂質および糖からなる複合化合物であり、O抗原およびエンドトキシンの活性成分として知られている [ジャー・エム・ギューセンおよびアール・ハッケンベック (J.M. Ghysen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー (New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール (Bacterial Cell Wall)、第18ページ、エルセヴィア (Elseveia) 社、1994年]。LPSの基本構造は、特異な脂質を有するリビドA、それに共有結合したRコアと呼ばれるオリゴ糖、さらにO特異多糖の3成分よりなっている (日経バイオテク編、「日経バイオテクノロジー最新用語辞典」、第431ページ、日経マグロウヒル社、1985年)。

【0003】 リビドAの基本構造は多くの菌種に共通であり、基本骨格は β -1、6結合のグルコサミニル・グルコサミンからなりC-1位およびC-4'位にそれぞれリン酸を結合している場合が多い。各アミノ基は3-ヒドロキシ脂肪酸を、水酸基は数種の飽和脂肪酸または

ヒドロキシ脂肪酸を結合し、独特の糖脂質を形成しているが、脂肪酸の種類は菌種によって多少異なっている。少数例であるが基本骨格が全く異なり、2、3-ジアミノ-2、3-ジデオキシ-D-グルコースのみからなる例も報告されている (野間惟道編、「医科学大辞典第49巻」、第82ページ、講談社、1984年)。

【0004】 Rコアの構造はサルモネラ属のようにそれに属する大部分の菌種に共通である場合と、大腸菌のように部分的に異なる数種の構造が知られている場合がある [ジャー・エム・ギューセンおよびアール・ハッケンベック (J.M. Ghysen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー (New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール (Bacterial Cell Wall)、第283ページ、エルセヴィア (Elseveia) 社、1994年]。一般にヘプトースと2-ケト-3-デオキシオクトネート (以下KDOと記載することがある) が多くのRコアに共通の構成成分であり、KDOを介してリビドAと結合しているが、菌種によっていずれか一方、または双方が欠如している LPS の存在も知られている [ジャー・エム・ギューセンおよびアール・ハッケンベック (J.M. Ghysen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー (New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール (Bacterial Cell Wall)、第294～295ページ、エルセヴィア (Elseveia) 社、1994年]。

【0005】 O特異多糖の構造は、構成成分の中で最も多様であり、菌種に特異的であって、いわゆるO抗原としての活性を示す。一般に数種の単糖からなるオリゴ糖の繰返し構造を特徴とするが、同一単糖からなるもの、または繰返し構造でないものも知られている。O特異多糖の生合成はRコアのそれとは異なる遺伝子の支配を受けており、接合または形質導入により異なる菌種のO特異多糖を置換することが可能であり、菌の毒力およびワクチンの研究等に応用されている [ジャー・エム・ギューセンおよびアール・ハッケンベック (J.M. Ghysen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー (New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール (Bacterial Cell Wall)、第265～267ページ、エルセヴィア (Elseveia) 社、1994年]。

【0006】 LPSは極めて多様な薬理作用を有しているが、例えば抗原およびLPSを同時に投与した場合、免疫反応が増強されることから、LPSは現在ワクチン効果を高める補助剤 (アジュバント) の一種として応用されている (本間謙也編、「細菌内毒素」、第312ページ、講談社、1973年)。LPSの分子量はその会合状態によって、数百万から数千までと多岐にわたることが報告されているが (本間謙也編、「細菌内毒素」、第217～218ページ、講談社、1973年)、分子

量が30,000~60,000程度のLPSとしては、分子量30,000±5,000、ヘキソサミン数45±6/分子量30,000、KDO数5±1/分子量30,000の大腸菌由来LPS(特開平4-49245号公報)、分子量40,000±10,000、ヘキソサミン数45±6/分子量30,000、KDO数5±1/分子量30,000の大腸菌由来LPS(特開平6-40937号公報)等がこれまでに報告されている。

【0007】LPSの用途についてはこの発明の発明者等により、これまでに抗トキソプラズマ剤(特開平4-492459号公報)、コレステロール低下剤(特開平4-49243号公報)、抗ヘルペス剤(特開平4-49242号公報)、抗リュウマチ剤(特開平4-49241号公報)、抗糖尿病剤(特開平4-49244号公報)、抗消化性潰瘍剤(特開平4-49240号公報)、免疫機能活性化剤(特開平4-99481号公報、特開平6-141849号公報)、経口・経皮免疫機能促進剤(特開平4-187640号公報)、鎮痛剤(特開平6-40937号公報)、発育促進剤(特開平3-155778号公報)、抗禁断症状剤(特開平6-65092号公報)等が提案されている。

【0008】しかしながら、通常、微生物から得られるLPSは、会合のため化学的に不均一(分子量と化学組成が異なる種々のLPSの混合物)で、その性状を理化学的に規定することは極めて困難であり、また毒性も高く、医薬品としての応用には限界があった(日本組織培養学会編、「細胞成長因子part I」、第121ページ、朝倉書店、1987年)。

【0009】また、この発明の発明者等は、分子量30,000~60,000程度のLPSの存在を示しているが(特開平4-99481号公報)、これは分子量5,000~6,000程度のLPSとの混合物であり、低分子量の画分の相当量を含有していた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】前記のとおり、従来報告されている高分子量のLPSは、低分子量LPSを含む不均一な混合物であり、例えば免疫機能活性化剤等の薬剤成分として臨床的に用いるには、安全性の面からも、あるいは薬効性能の面からも必ずしも満足のできるものではなかった。

【0011】このため、従来技術を改良し、高度に精製された高分子量LPSを分離し、その産業上の有用性を検討することが待望されていた。この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、安全性が高く(即ち、毒性が低く)、かつ生物活性が優れ、化学的に特定された新規な高分子量LPSを提供することを目的としている。

【0012】

【課題を解決するための手段】この発明の発明者等は、

前記の課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、従来報告されているLPSから理化学的に特定される高分子量LPSを精製し、しかもこの新規な高分子量LPSが、従来のLPSに比べて極めて安全性が高く、かつ生物活性も従来のLPSに比して優れていることを見い出し、この発明を完成した。

【0013】すなわち、この発明は、微生物菌体から得られ、次のa)~c)の理化学的性質、

- a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が30,000~60,000であり、分子量10,000以下の画分を実質的に含まないこと、
- b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が3~9個/分子量30,000であること、および
- c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトノート含量が20~30個/分子量30,000であること、を有する高分子量リポポリサッカライドを提供する。

【0014】また、この発明においては、前記の微生物がグラム陰性細菌であること、さらにはそのグラム陰性細菌がパントエア属に属する微生物であることを望ましい態様としてもいる。以下、この発明について詳しく説明する。なお、以下の説明において、百分率の表示は、特に断りのない限り、重量による値である。

【0015】この発明の高分子量LPSは、グラム陰性の微生物、例えば、パントエア属に属する微生物等を、常法により培養し、培地から菌体を集め、集めた菌体から公知の方法、例えば、熱フェノール法[オーラ・ウエストファール(O. Westphal)編、メリッズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)、第5巻、第83ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)社、1965年]により抽出し、さらに、陰イオン交換樹脂により精製して製造できる。即ち、微生物の菌体を蒸留水に懸濁し、この懸濁液を蒸留水および等容量の熱フェノールの混合液に添加して攪拌し、次いで遠心分離して水層を回収し、この水層を透析してフェノールを除去し、限外濾過法により濃縮して粗LPS画分を採取し、この画分を常法の陰イオン交換クロマトグラフィー(例えば、モノQ-セファロースまたはQ-セファロースを使用する)により精製し、常法により脱塩する。

【0016】このようにして得られた精製LPSを、例えばデオキシコール酸ナトリウム等の界面活性剤の存在下でゲル濾過することにより、高分子量LPSを含有する画分のみを回収し、混在する低分子量LPSを除去し、高度に精製されたこの発明の新規な高分子量LPSを得ることができる。以上の方法により製造されたこの発明の高分子量LPSは、後記する試験例1に示すとおり、

a) タンパク質マーカーを用いて SDS-PAGE 法で測定した分子量が 30,000~60,000 であり、分子量 10,000 以下の画分を実質的に含まないことを、

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が3~9個/分子量30,000であること、および

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が20~30個/分子量30,000であることという理化学的性質を有している。

【0017】この発明の新規な高分子量LPSは、免疫機能活性化作用を有する医薬品、動物用薬品等として使用することもでき、また、他の公知の免疫機能活性化作用を有する物質と併用することもできる。次に試験例を示し、この発明の高分子量LPSについてさらに詳しく説明する。

試驗例 1

この試験は、この発明の高分子量LPSの理化学的および生物学的性質を調べるために行った。

1) 試料の調製

実施例1および参考例1と同一の方法により高分子量LPSおよび従来のLPSをそれぞれ調製した。

2) 試験方法

①分子量の測定

高分子量LPSおよび従来のLPS(以下単にLPSと記載する)を各々蒸留水に溶解して2mg/mlの濃度の溶液を調製し、その10μgを1.5ml容プラスチックチューブに秤取した。これとは別に、180μlの10%(w/v)SDS、45μlの5%β-メルカプトエタノール、90μlのCBB色素溶液、112.5μlの0.5Mトリス塩酸(pH6.8)および22.5μlの蒸留水を加えて調製したSDS処理液10μlを、前記各試料溶液に添加して十分混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸し、その後直ちに氷水中に浸して急冷した。

【0018】10m1の10% (w/v) SDS、17.9 gのトリシンおよび3.03 gのトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をスラブゲル電気泳動槽 (マリソル社製) に入れた。20%ポリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を50Vに1時間、次いで、150Vに固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を継続した。泳動終了後に、銀染色キット 161-0443 (バイオラッド社製) により室温で銀染色を行い、挙動を確認した。

6

②ヘキソサミン含有量の定量
 ヘキソサミン含有量を、エルソン-モルガン(Elson-Mor-gan)法(日本生化学会編、「生化学実験講座」、第4巻、第377~379ページ、第1版、東京化学同人出版、1976年)により次のとおり定量した。LPSを蒸留水に溶解して2mg/mlの濃度の溶液を調製し、その100μlをスクリューキャップ付きスピッツ(イワキガラス社製)に秤取し、これに100μlの8NHClを添加して110℃で16時間加熱し、のち4NNaOHを約200μl添加してpHを7に調整した。その100μlを秤取し、別のスクリューキャップ付きスピッツに入れ、200μlの試薬Aを加え、105℃で1.5時間加熱し、流水で冷却した。次いで、その100μlを分取し、670μlの9.6%エタノールを加え、さらに67μlの試薬Bを加え、室温で1時間放置し、535nmにおける吸光度を測定した。検量線作成用標準試料としては0~800μg/mlのN-アセチルグルコサミン(和光純薬工業社製)を用いた。

試薬A: 7.5 μl のアセチルアセトンと 2.5 ml の
1.25 N 炭酸ナトリウムとの混合液。

試薬B: 1. 6 g の p-ジメチルベンズアルデヒド、30 ml の濃塩酸および30 ml の 96% エタノールの混合液。

③KDO含量の定量

KDO含有量をジフェニルアミン法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry) 、第58巻、第1号、第123~129ページ、1974年] により次のとおり定量した。

〔0019〕 500mgのジフェニルアミン（和光純薬社製）、5mlのエタノール（和光純薬社製）、4.5mlの冰酢酸（和光純薬社製）、50mlの濃塩酸（和光純薬社製）を混合してKDO検出試薬を調製した。その500μlに、0.50mg/mlの濃度で各試料を含む250μlの水溶液を混合し、100℃の沸騰水浴中で30分間加熱し、のち恒温水（24～25℃）中で30分間冷却し、分光光度計（日立製作所製。モデルU-2010）により420、470、630、650nmでの吸光度を測定した（測定値を各々A420、A470、A630、A650と記載する）。標準試料として、0.5μモルの濃度のKDOアンモニウム塩（シグマ社製）水溶液250μlを使用した。

【0020】検体試料および標準試料の4種の測定値から、式(1)によりS値を求め、検体試料および標準試料のS値をそれぞれ S_1 および S_2 とした。次いで式(2)によりKDOのモル数Xを算出した。

$$S = A420 - A470 + A630 - A650 \dots \dots \dots \quad (1)$$

$$X = (0.5 \times S_w \times LPS \text{ 1モルの分子量}) / (0.5 \times S_t \times 10^6) \quad \dots \quad (2)$$

④リムラス活性の測定

50 リムラス活性とは、1968年にレビンにより創案さ

7

れたカブトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法であるリムラステスト（鈴木郁生編、「医薬品の開発第14巻：医薬品の品質管理及び試験法」、第227～243ページ、廣川書店、1990年）で陽性を呈することを意味し、このリムラステストはLPS検出法として知られている。標準品として、345 pg/EUのイー・コリ(E. coli) O111:B4を用いてトキシカラーシステム（生化学工業社製）を使用して測定した。

3) 試験結果

①分子量

分子量測定の結果は、図1に示すとおりである。図1は、SDS-PAGE泳動図であり、図中レーン1は同時に泳動させたタンパク質およびペプチド分子量マーカー-[94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 20. 1 kDa, 17. 2 kDa, 14. 6 kDa, 14. 4 kDa, 8. 24 kDa, 6. 38 kDa, 2. 56 kDa (ファルマシア社製)]、レーン2、3および4はLPS (20 μg, 5 μg および1. 25 μg)、レーン5、6および7は高分子量LPS (20 μg, 5 μg および1. 25 μg) であり、図の縦軸は、分子量を示す。

【0021】高分子量LPSの分子量は図1のよう、30 kDaから60 kDaであった。また、レーン5では20 μgの高分子量LPSを泳動させたにもかかわらず、低分子量LPSは全く認められなかった。以上の結果から、この発明の高分子量LPSの分子量は、30,000～60,000であり、低分子量LPSが完全に除去されていることが判明した。②ヘキソサミン含量この発明の高分子量LPSのヘキソサミン数は6. 18/分子量30,000であった。

③KDO含量

この発明の高分子量LPSに含まれるKDOは25. 38/分子量30,000であった。

④リムラス活性

この発明の高分子量LPSのリムラス活性は1. 45 EU/ngであった。

【0022】なお、微生物の種類および試料の製造方法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

試験例2

この試験は、この発明の高分子量LPSの急性毒性を調べるために行った。

(1) 試料の調製および試験方法

実施例1と同一の方法で調製した高分子量LPSおよび参考例1と同一の方法で調製したLPSの毒性を、7週齢のC3H/Heマウス（日本チャールス・リバー社から購入）を用いて試験した。1群4匹からなるマウス群に、各試料を生理食塩水に溶解し、1匹あたり5. 0、1. 0または2. 0 mg/kgの割合で静脈内に投与した。投与後72時間マウスの生死を観察した。

(2) 試験結果

8

この試験の結果は表1に示すとおりである。表1から明らかなように、静脈内投与の場合、この発明の高分子量LPSでは2.0 mg/kg投与で4匹中3匹のマウスが死亡し、LD₅₀は1.8 mg/kgであったが、LPSでは1.0および2.0 mg/kgの投与量で全数が死亡し、LD₅₀は6.0～8.6 mg/kgであった。なお、微生物の種類および試料の製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0023】

【表1】

試料	静脈内投与			
	投与量 (mg/kg)	死亡数	死亡率(%)	LD ₅₀
LPS	5	0/4	0	
	1.0	4/4	100	
	2.0	4/4	100	7.1 (6.0-8.6)
高分子量 LPS	5	0/4	0	
	1.0	0/4	0	
	2.0	3/4	75	1.8 (1.3-2.4)

【0024】試験例3

この試験は、この発明の高分子量LPSを皮内投与した場合の毒性を調べるために行った。

(1) 試料の調製および試験方法

試験例2と同一の高分子量LPSおよびLPSを1匹あたり1.0、2.0、4.0または8.0 mg/kgの用量で腹部皮内に投与したことを除き、試験例2と同一の方法により試験した。

(2) 試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなように、LPSを4.0および8.0 mg/kg投与した場合、いずれも4匹中4匹が死亡した。これに対して、高分子量LPSにおいては4.0 mg/kgの投与量では死亡例が0であり、8.0 mg/kgの投与量で4匹中3匹が死亡した。

【0025】前試験例2および試験例3の結果から、LD₅₀を算出すると表3のとおりである。表3から明らかなように、高分子量LPSのLD₅₀の値はLPSのそれに比べて、静脈内投与および皮内投与のいずれにおいても約2.5倍であった。これらの結果は、LPSの分子量の相違が毒性に影響を及ぼすことを示しており、高分子量LPSは、従来のLPSに比して静脈内および皮内投与のいずれの場合においても、極めて毒性の低いことが判明した。なお、微生物の種類および試料の製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0026】

【表2】

試 料	皮 内 投 与			
	投 与 量 (μ g/kg)	死 亡 数	死 亡 率 (%)	LD ₅₀
LPS	1.0	0/4	0	
	2.0	0/4	0	
	4.0	4/4	100	
	8.0	4/4	100	28 (23-34)
高分子量 LPS	1.0	0/4	0	
	2.0	0/4	0	
	4.0	0/4	0	
	8.0	3/4	75	72 (52-98)

* [0027]
[表3]

*

試 料	毒 性 (LD ₅₀) (mg/kg)	
	静 脈 内 投 与	皮 内 投 与
LPS	7.1 (6.8-8.6) 7.0 (2.5-20)	28 (23-34)
高分子量LPS	18 (13-24)	72 (52-98)

【0028】試験例4

この発明の高分子量LPSの生物活性を、抗腫瘍作用を有するTNF産生能を指標として調べた。

1) 供試動物および試験方法

各群3匹の7週齢の雄C3H/Heマウス(日本チャーレズ・リバー社より購入)を用い、腹部皮内投与によりTNF産生効果を次のとおり試験した。

【0029】実施例1と同様の方法で製造した高分子量LPSまたは参考例1と同じ方法で得られたLPSを1、10または100 μ g含む生理食塩水0.05mlを各マウスの腹部皮内に注射し、その1.5時間後に採血して常法により血清を分離した。得られた各血清中のTNF活性を、L929細胞に対する毒性に基づく方法により、次のとおり測定した。即ち、L929細胞を5%ウシ胎児血清を含有するMEM培地で 8×10^4 個/100 μ lの濃度で調製し、これを96穴平底プレートの各穴に100 μ lづつまき、37°Cで2時間、5%CO₂存在下で培養した。その後アクチノマイシンDを1 μ g/mlの割合で添加し、MEM培地で段階希釈した※

※血清試料または陽性対照ヒトTNF- α (旭化成社製)を50 μ lづつ添加し、さらに同一条件で18時間培養した。培地をアスピレーターで除去し、37°CのPBSで洗浄して死細胞を完全に除去し、0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて生細胞を染色した。この染色度をOD(590nm)での吸光度を指標として測定し、陽性対照として用いたTNF- α の希釈率と吸光度との関係をもとにTNF活性を算定した。

2) 試験結果

この結果は、表4に示すとおりである。表4においてTNF活性は各群3匹の平均値である。この結果からこの発明の高分子量LPSのTNF産生効果は、参考例1の方法で得られるLPSと比較して、約2倍であることが認められた。なお、微生物の種類および試料の製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0030】

【表4】

試 料	投 与 量 (μ g/匹)	血清中TNF濃度(単位/ml)	
		皮 内 投 与	
LPS	1.0	4.0	
	10	13.1	
	100	25.5	
高分子量 LPS	1.0	7.7	
	10	24.3	
	100	54.2	

【0031】参考例1

トリプトン(ディフコ社製)10g、酵母エキス(ディフコ社製)5g、NaCl(和光純薬工業社製、特級)10gを蒸留水1リットルに添加し、NaOHでpHを7.5に調整し、オートクレーブで滅菌し、別に滅菌したグルコース(和光純薬工業社製、特級)を0.1%の

割合で添加した培地(以下L-肉汁培地と記載する)100mlの入った500ml容の坂口フラスコに、-8°Cで保存されているパントエア・アグロメランス(Pantoea agglomerans)保存菌株から單一コロニーを分離して接種し、35°Cで1夜振とう培養し、そのまま全量を501,000mlのL-肉汁培地の入った3リットル容の

坂口フラスコに接種し、同様に培養した。

【0032】さらに、7リットルのL-肉汁培地の入った10リットル容の卓上型ファーメンター（丸菱バイオエンジニア社製）に培養した菌体を接種し、同条件で通気培養し、のち集菌し、約70gの湿菌体を回収し、これを凍結保存した。凍結保存菌体約70gを500mlの蒸留水に懸濁し、500mlの90%熱フェノールを添加して65～70℃で20分間攪拌し、冷却し、10,000G、4℃で20分間遠心処理し、水層を回収した。フェノール層をさらに1回前記と同一の操作を反復し、回収した2回の水層を合し、1夜透析してフェノールを除去し、透析内液を限外濾過装置（アドヴァンテック・トーヨー社製。UK-2000）を用いて分子量20万カットオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮した。

【0033】得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社製。Q-セファロース・ファースト・フロー）にかけ、10mMトリス-HCl (pH 7.5) および10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200～400mM NaCl/10mMトリス-HCl (pH 7.5) でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約70gの湿菌体から約300mgの精製LPSを得た。

【0034】次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0035】

【実施例】

実施例1

参考例1と同一の方法で得た精製LPS 100mgを5mg/mlの濃度で可溶化緩衝液〔3%デオキシコール酸ナトリウム（和光純薬工業社製）、0.2M塩化ナトリウム、5mMEDTA-2Naおよび20mMトリス-塩酸からなり、pH 8.3〕に溶解し、精製LPS溶液20mlをセファクリルS-200HRカラム（ファルマシア社製）の上部に静かに重層し、溶出緩衝液〔0.25%デオキシコール酸ナトリウム（和光純薬工業社製）、0.2M塩化ナトリウム、5mMEDTAおよび10mMトリス-塩酸からなり、pH 8.3〕により流速1.6ml/時で800ml（50時間）溶出した。

【0036】ペリスタポンプPI（ファルマシア社製）を用いて流速を制御しながら、得られた溶出液を、フラクションコレクター（アドバンテック社製。SF2120）により分画し、最初の240ml（24フラクション分）を廃棄し、その後10ml/フラクションで80フラクションまで分画した。溶出した各画分について原

液または希釈液でフェノール／硫酸法（福井作蔵編、「還元糖の定量法・第2版」、第50～52ページ、学会出版センター、1990年）により糖の定量を行い、溶出状態を調べた。得られた溶出状態の結果から、LPSの存在が予想される分画（フラクション30～60）のうち、フラクション37～55の各フラクション0.5mlを用いてSDS-PAGEを行い、LPSの分画パターンを調べた。その結果、フラクション30～36では高分子量（分子量約30～60kD）LPSのみが認められ、フラクション37～44では高分子分量および低分子量の両方のLPSが認められたので、フラクション30～36の高分子量LPS分画を次のとおりさらに精製した。

【0037】各画分を混合して凍結乾燥し、エタノールに懸濁し、遠心分離によりエタノールに可溶なデオキシコール酸を除去し、高分子量LPS画分のエタノール処理をさらに2回反復し、デオキシコール酸を除去し、次に70%エタノールに再度懸濁し、遠心分離で緩衝液成分を除去し、この操作をさらに3回反復し、高分子量LPSを不溶性画分に回収し、凍結乾燥し、精製した高分子量LPS約4.7mgを得た。

実施例2

参考例1と同様の方法によりL-肉汁培地でバントエア・アグロメラنس菌を培養し、湿菌体約100gを得た。この湿菌体50gを生理食塩水で洗浄した後、250mlの冷水に懸濁し、4℃に冷却した等量の0.5Nトリクロロ酢酸（以下TCA）水溶液を加えて3時間振とうした後、4℃で6,000×gで30分遠心した。

さらに、沈殿を同様の操作にてTCAで抽出し、各上清を合し、約450mlの上清を得た。この上清のpHを6.5に調整した後、-10℃に冷却したエタノール900mlを攪拌しながら加えて、-4℃で一夜放置した。その後、沈殿を水に溶かして透析した後、27,000×gで30分間遠心して上清を回収し、これを凍結乾燥し粗LPSとした。

【0038】得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー（ファルマシア社製。Q-セファロース・ファースト・フロー）にかけ、10mMトリス-HCl (pH 7.5) および10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200～400mM NaCl/10mMトリス-HCl (pH 7.5) でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約200mgの精製LPSを得た。

【0039】以下、実施例1と同様の方法で、この精製LPS 100mgをデオキシコール酸ナトリウム存在化で、セファクリルS-200HRカラム（ファルマシア社製）を用いてゲル濾過し、各画分の糖含量を測定し、

LPSの存在が予想される画分について SDS-PAGEをおこない、高分子量LPSのみが存在する画分を回収し、凍結乾燥後エタノールに懸濁し、遠心分離によりエタノールに可溶なデオキシコール酸等の不純物を除去し、不溶性画分に回収された高分子量LPSを凍結乾燥し、精製高分子量LPS約51mgを得た。

【0040】

【発明の効果】以上詳しく述べたとおり、この発明により、医薬品等として使用し得る安全性が極めて高く、かつ生物活性の高い新規な高分子量LPSが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、高分子量LPSおよびLPSのSDS-PAGE電気泳動図である。

【図1】

